

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang. Kegiatan penelitian ini dimulai pada bulan Desember 2018 sampai dengan bulan Maret 2019.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri diameter 9 cm, mikroskop optilab, kaca preparat, cover glass, beaker glass, mortal – martil, plastik, wrapping, pisau, scalpel blade, pinset, jarum ose, gelas ukur, erlenmeyer, autoclaf, UV LAF, alumunium foil, tisu, vortex, timbangan dan kertas label.

Bahan yang digunakan adalah aquades, alkohol 70%, sampel tanah hasil eksplorasi, sampel buah kakao hasil eksplorasi, media PDA (Potato Dextrose Agar), media V8 Juice (Air sari V8, CaCo<sub>3</sub>, agar – agar).

#### **3.3. Variabel Pengamatan**

Variabel penelitian ini terdiri dari dua jenis, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yaitu identifikasi dan karakterisasi jamur antagoni *Trichoderma* sp. dan patogen *P. palmivora*. adapun variabel terikat yaitu uji antagonis atau presentase penghambatan *Trichoderma* sp. terhadap *P. palmivora*.

#### **3.4 Metode Pelaksanaan**

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL yang disusun secara faktorial dengan 2 parameter. Faktor yang pertama adalah jenis *Trichoderma* sp., faktor yang kedua adalah jenis *Phytophthora palmivora*, seluruh

kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Jadi jenis *Trichoderma* sp. ada 4 dan jenis *Phytophthora palmivora* ada 4 total  $4 \times 4 = 16 \times 3 = 48$ . Perlakuan yang diberikan yaitu :

T : *Trichoderma* sp

TR1 : *Trichoderma* sp. asal isolat perkebunan Kakao Suruh Kab. Trenggalek

TR2 : *Trichoderma* sp. asal isolat perkebunan Kakao Karanganyar Kab. Trenggalek

JB1 : *Trichoderma* sp. asal isolat perkebunan Kakao PUSLITKAKAO Jember

JB2 : *Trichoderma* sp. asal isolat perkebunan Kakao Banjarsari Kab. Jember

P : *P. palmivora*

P1 : *P. palmivora* asal isolat perkebunan kakao Suruh Kab. Trenggalek

P2 : *P. palmivora* asal isolat perkebunan kakao Karanganyar Kab. Trenggalek

P3 : *P. palmivora* asal isolat perkebunan kakao PUSLITKAKAO kab. Jember

P4 : *P. palmivora* asal isolat perkebunan kakao Banjarsari Kab. Jember

### 3.5 Analisis Data

Data identifikasi dan karakterisasi hasil eksplorasi dianalisis secara deskriptif. Data uji antagonis atau presentase penghambatan *Trichoderma* sp. terhadap *P. palmivora* dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) selanjutnya di uji lanjut menggunakan BNJ 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diukur.

### 3.6 Pelaksanaan Penelitian

#### a. Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan media agar PDA dilakukan dengan membersihkan dan mengupas kentang yang sehat (tanpa cacat). Kentang yang sudah bersih dipotong dadu dan menimbang kentang dengan berat 200 gr. Memasukkan kentang ke dalam

beaker glass, menambahkan aquadest sampai 1000 mL. Merebus kentang selama  $\pm$  45 menit dan menambahkan aquades sampai 1000 mL. Menambahkan 20 gr gula pasir. Menambahkan 20 gr Dextrose Agar. Memanaskan larutan dan mengaduk hingga homogen. Sterilisasi media PDA yang sudah siap digunakan.

#### **b. Pembuatan Media V8 Juice**

Media V8 Juice digunakan untuk menumbuhkan isolat *Phytophthora palmivora* dari isolasi buah kakao yang terserang *Phytophthora palmivora*. Air sari V8 disaring sebanyak 200mL kemudian campurkan  $\text{CaCO}_3$  sebanyak 3 gram, agar – agar sebanyak 20 gram dan diaduk sampai bahan tercampur semua kemudian tambahkan aquades sampai volume 1000 mL masak sampai mendidih kemudian sterilisasikan.

#### **c. Eksplorasi cendawan *Trichoderma* sp.**

Cendawan *Trichoderma* sp. dieksplorasi pada perkebunan kako di daerah Kabupaten Trenggalek dan Kabupaten Jember. Titik pengambilan tanah ditentukan dengan kriteria kondisi pertanaman kakao yang sehat tanpa ada gejala penyakit yang menyerang tanaman kakao tersebut. Setelah ditentukan tanaman kakao kemudian menggali tanah yang akan di ambil sedalam 15 cm (Juli dan Sutarman, 2014). Sampel tanah yang telah di eksplorasi ditimbang sebanyak 10 gram kemudian dicampur dengan aquades sampai volume 100 ml dan di homogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 30 menit kemudian diamkan selama 10 menit. Tujuan setelah dihomogenkan didiamkan supaya cairan pengendap karena yang dipakai adalah cairan hasil dari endapan. Setelah itu lakukan seri pengenceran sampai  $10^3$  kemudian ambil suspensi pada pengenceran  $10^3$  menggunakan syringe

/ mikro pipet sebanyak 0,1 ml kemudian ditumbuhkan pada media PDA. Inkubasi selama 3 x 24 jam, amati koloni yang tumbuh kemudian di murnikan pada media PDA (Lab BBPPTP Surabaya, 2017).

#### **d. Eksplorasi dan Isolasi patogen *P. palmivora***

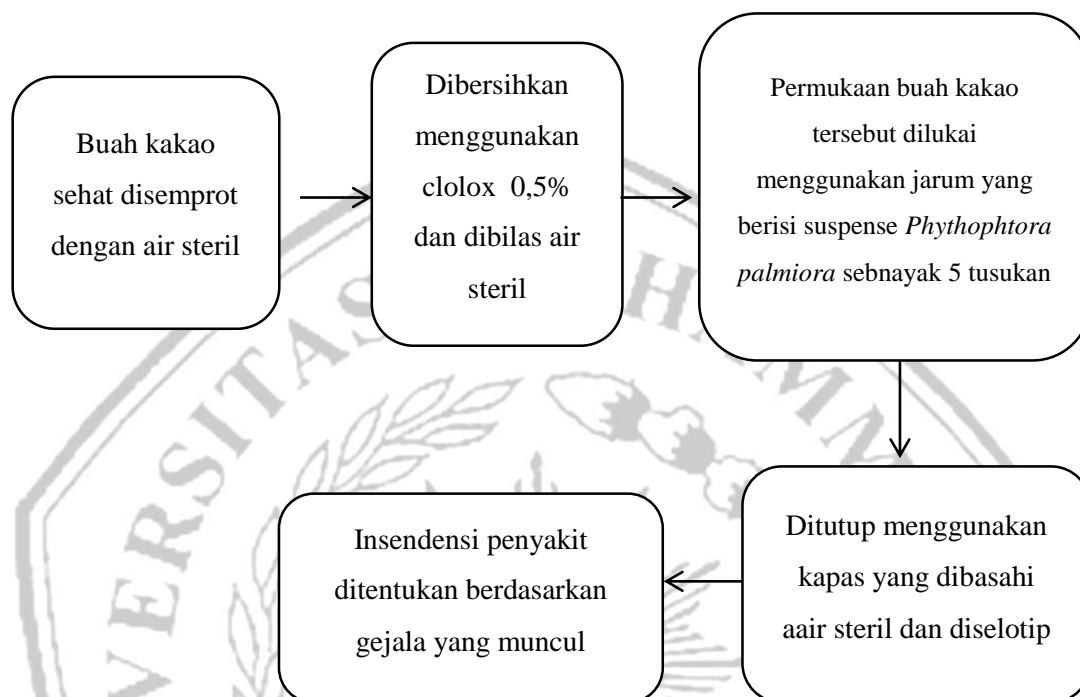
Patogen *P. palmivora* dieksplorasi dari buah kakao yang terserang *P. palmivora* dengan ciri terdapat bercak berwarna coklat kehitaman dengan batas pada buah jelas yang dimulai dari pangkal buah. *P. palmivora* diisolasi dari buah kakao yang sakit dengan gejala bercak berwarna cokelat kehitaman. Permukaan buah kakao disterilisasi dengan tisu yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. Sedikit (0,5 cm) daging buah diambil dari jaringan di antara yang bergejala sakit dan sehat, kemudian ditanam ke dalam media agar air (WA) 2% dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang. Setelah 4 hari, miselia jamur yang tumbuh dimurnikan pada media V8 agar (200 ml jus V8, 800 ml aquades, 1 g CaCO<sub>3</sub> dan 20 g agar) dan diidentifikasi menggunakan protokol standar identifikasi *P. palmivora*. Setelah positif bahwa yang didapat adalah isolat *P. palmivora*, jamur diperbanyak pada medium V8 agar dan diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari (Rita Harni., dkk 2013).

#### **e. Identifikasi cendawan**

Identifikasi cendawan dilakukan setelah cendawan tumbuh koloni, cendawan *Trichoderma* sp. diidentifikasi menggunakan mikroskop agar diketahui jenis *Trichoderma* yaitu dengan cara koloni pada pengamatan mikroskop di amati berdasarkan jurnal atau buku sehingga diketahui jenis *Trichoderma* sp. begitu pula

pada identifikasi patogen *P. palmivora* diidentifikasi pada mikroskop dan diamati berdasarkan jurnal dan buku.

**f. Uji postulat koch cendawan**



Gambar 8. Flowchart uji postulat koch cendawan (Sumber : Eka Retnosari., dkk 2014).

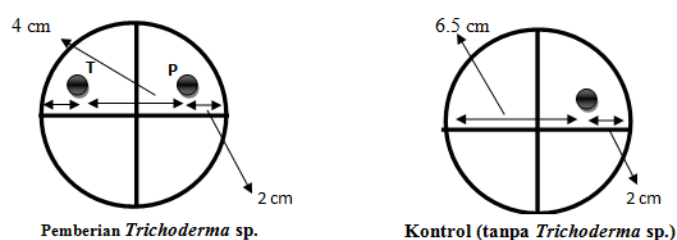
**g. Isolasi *P. palmivora* dari Hasil Uji Postula Koch**

Hasil uji postula koch selanjutnya di isolasi menggunakan media V8 dan dibandingkan dengan isolasi *P. palmivora* hasil eksplorasi jika menunjukkan ciri – ciri yang sama maka uji postula koch dapat membuktikan gejala serangan *P. palmivora*.

**h. Uji Antagonisitas *Trichoderma* sp. terhadap patogen *P. Palmivora***

Uji Antagonisitas *Trichoderma* sp. terhadap penyakit busuk buah kakao *P. palmivora* dilakukan pada media PDA dalam cawan petri dengan meletakkan potongan isolat *P. Palmivora* berumur 7 hsi pada medium PDA dalam cawan petri dengan jarak 2 cm dari tepi cawan petri dan memberi tanda P. Kemudian pada sisi

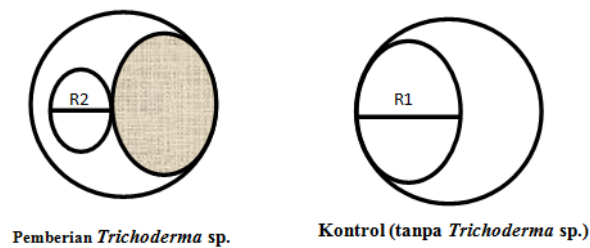
yang bersebrangan, diletakkan potongan isolat *Trichoderma* sp. dengan jarak 2 cm dari tepi cawan petri kemudian memberi tanda T. pengamatan jari - jari pertumbuhan patogen *P. Palmivora* dilakukan sejak satu hari setelah uji sampai dengan tujuh hari setelah uji (Lab. BBPPTP Surabaya, 2017).



Gambar 8. Uji Antagonisme *Trichoderma* sp. dengan *Phytophthora palmivora*.

#### i. Pengamatan Jari - jari pertumbuhan *P. palmivora*

Jari - jari pertumbuhan *P. palmivora* dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni masing – masing jamur hingga terjadi kontak antara *Trichoderma* sp. dan *P. Palmivora*. Berdasarkan instruksi kerja di BBPPTP Surabaya 2017 langkah – langkah kerja yaitu menyiapkan isolat *Trichoderma* sp. dan *P. Palmivora*. Kemudian potong menggunakan bor gabus 0,5 cm. siapkan petridish yang berisi media PDA kemudian buatlah garis horizontal pada luar petridish setelah itu garis vertikal pada tengah – tengah petridish. Buatlah jarak tepi 2 cm dari kiri beri simbol R (*P. Palmivora*) dan 2 cm dari kanan dan beri simbol T (*Trichoderma* sp.). Letakkan potongan *Trichoderma* sp. dan *P. Palmivora* berdasarkan simbol pada petridish kemudian amati pertumbuhan jari – jari koloni *P. Palmivora* sampai *Trichoderma* sp. mampu menghambat *P. Palmivora*.



Gambar9. Pertumbuhan koloni *Trichoderma* sp. dan *Phytophthora palmivora*.

Keterangan :

T : Koloni *Trichoderma* sp.

R1 dan R2 : Koloni *P. palmivora*.

Setelah diketahui jari – jari koloni *Trichoderma* sp. dan *P. Palmivora* kemudian *Trichoderma* sp. dan *P. Palmivora* di hitung presentasi penghambatan menggunakan rumus :  $Z = \frac{R1-R2}{R1} \times 100\%$  (Lab. BBPPTP Surabaya, 2017).

Keterangan :

Z : Persentase penghambatan.

R1 : Jari-jari *P. palmivora* tanpa *Trichoderma* sp. (Kontrol).

R2 : Jari - jari *P. palmivora* dengan *Trichoderma* sp.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Analisis Sidik Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ANOVA untuk mengetahui keefektifan *Trichoderma* sp. Jika ada pengaruh yang berbeda nyata akan dilakukan uji lanjut menggunakan BNJ 5%.